

Vers une optimisation de la détection du virus de la mosaïque en tiret (BSV) chez le bananier

Marie-Line Iskra-Caruana

CIRAD, UMR BGPI, 34398 Montpellier, FRANCE

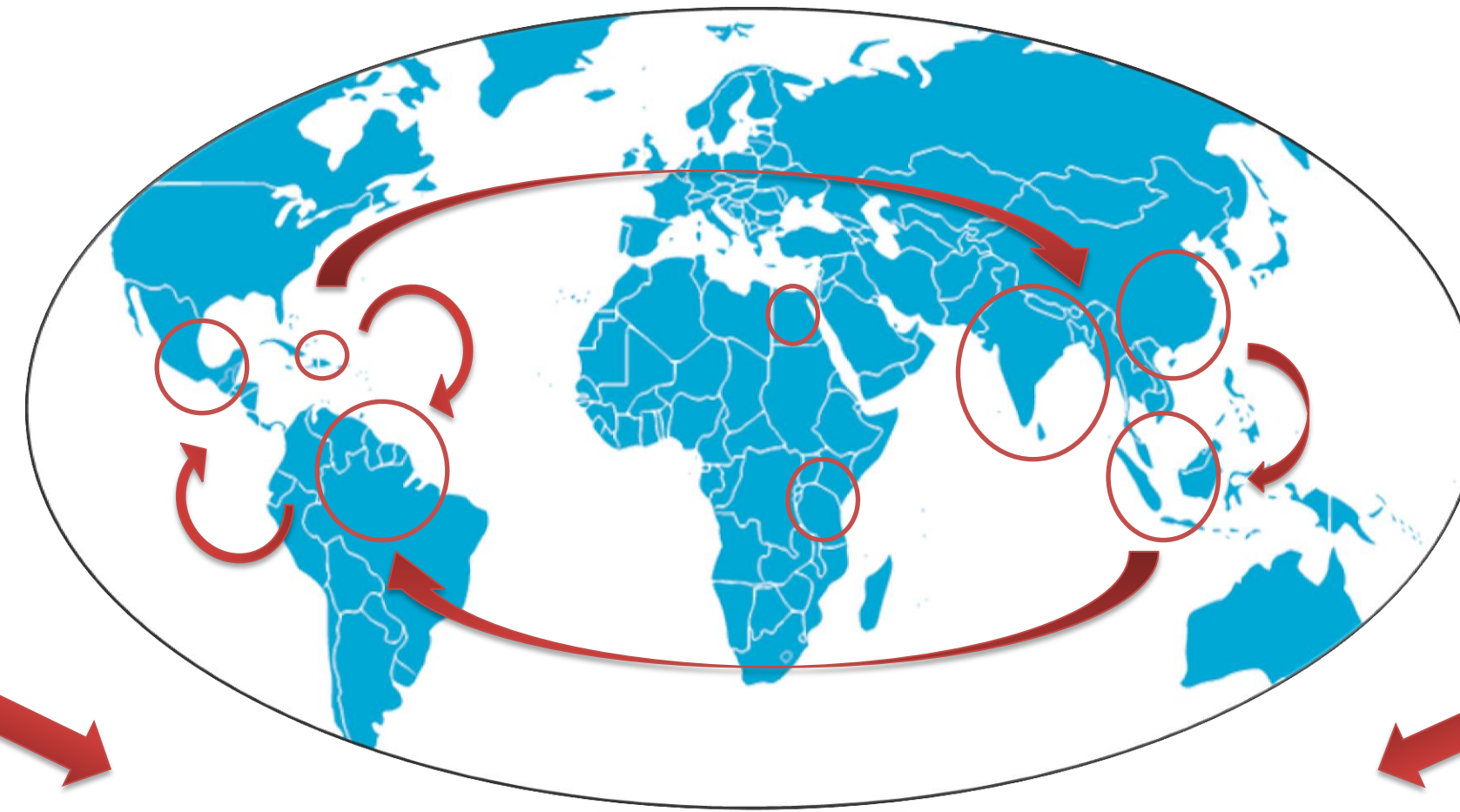
Poster réalisé par Florian Carlet & Marlène Limpalaër

Option Protection des Plantes et Environnement, Montpellier SupAgro

LA BANANE ET SES ENJEUX

Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2009 13(4), 575-586

- ❖ La banane est la 4^{ème} **ressource vivrière** de la planète, ressource alimentaire pour plus de 400 millions d'habitants des régions tropicales (Source : FAO).
- ❖ Le **nombre de régions productrices** est important. Que ce soit vis-à-vis de la banane dessert ou plantain, ces régions dépendent très fortement de la ressource (autoconsommation, exportation).
- ❖ Il y a actuellement une forte demande de **sécurité alimentaire** des produits par les consommateurs.



Comment garantir des échanges de matériel sain entre les régions productrices et avec les zones de quarantaine?

LE PATHOSYSTÈME BSV

Rapport de l'analyse du risque phytosanitaire du BSV, Cirad, 2003
Iskra-Caruana ML et al., 2010. Molecular Plant Microbe Interactions

- ❖ Le BSV est un virus bacilliforme du genre *Badnavirus*, de la famille des *Caulimoviridae*. Il est **intégré** au génome *M. balbisiana* (noté B) de la plante hôte, sous la forme d'eBSV (endogenous BSV) capables de restituer des virions infectieux.
- ❖ Des hybrides de *M. balbisiana*, systématiquement porteurs de ces eBSV et d'intérêt agronomique, sont fréquemment produits et envoyés dans les différentes régions du monde...

Le BSV, « l'ennemi intérieur »

CARACTÉRISTIQUES BIOLOGIQUES

Rapport de l'analyse du risque phytosanitaire du BSV, Cirad, 2003

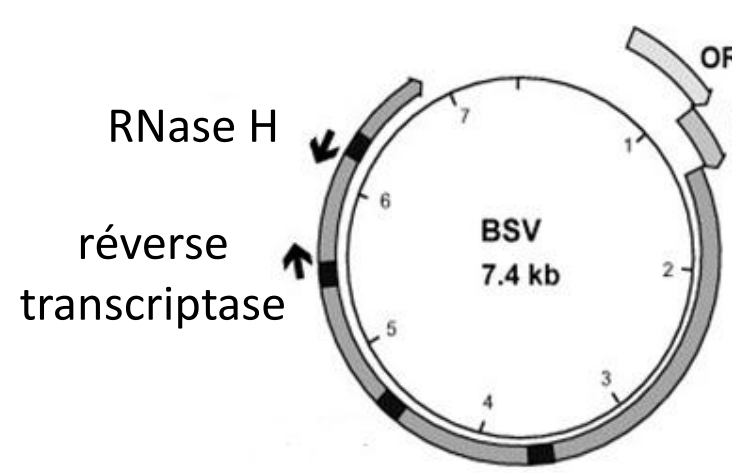


- **Symptômes** : tirets jaunes à la surface des feuilles évoluant en nécroses, éclatement du pseudo-tronc
→ baisses de rendement, régimes déformés de calibre plus petit
- **Cycle biologique** dans le bananier et transmission par cochenille à un autre plant

L'infection est liée aux **deux formes virales** : **libre (BSV)** et **intégrée (eBSV)**.

STRUCTURE DU GÉNOME

Harper G. et al., 2003. Virus Research



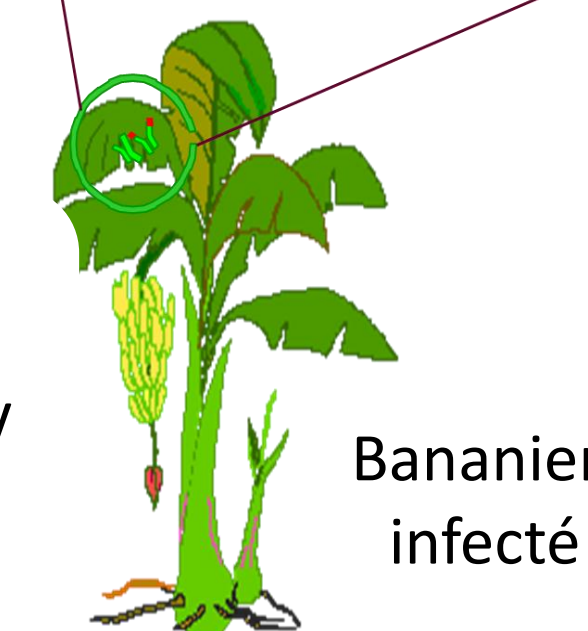
3 ORF dont ORF 3 porteuse de RNase H et reverse transcriptase (base de la détection moléculaire)

CRÉATION D'HYBRIDES CONTENANT DES EBSV

BB
Parent
M. balbisiana ayant des eBSV

AAAA
Parent sain

BAA
Hybride interspécifique possédant un eBSV infectieux



Les hybrides obtenus présentent des caractères d'intérêt agronomique :
- robustesse du bananier
- tolérance à un champignon *Mycosphaerella*

Malheureusement, ils possèdent des eBSV, susceptibles de restituer un génome viral complet sous l'action de stress.

Iskra-Caruana ML et al., 2010. Molecular Plant Microbe Interactions

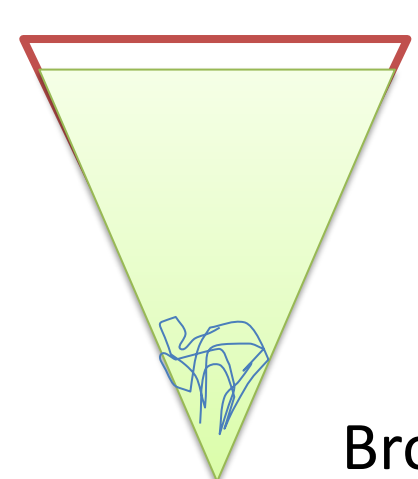
→ La présence des eBSV fausse le diagnostic BSV avec les méthodes habituelles de détection car le % d'identité entre les deux séquences est très grand (>97%)

En quoi le diagnostic habituel pose problème?

Com. pers. ML Iskra-Caruana

PCR classique

- BSV libre
- eBSV de la plante

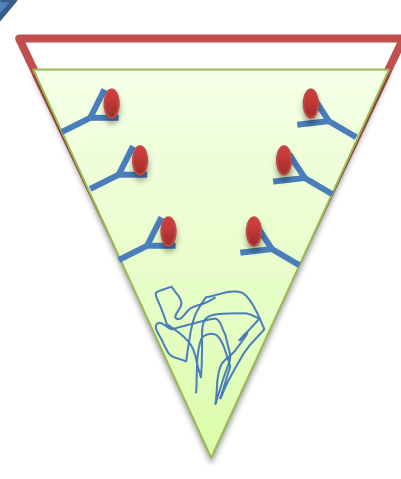


Broyat de plantes
+ Purification

Amplification des deux types d'ADN
→ **interprétation difficile**

Immunocapture-PCR

Anticorps anti-BSV
à partir d'un sérum polyclonal



- 98% de BSV lié aux anticorps
- 1% de virus libre n'ayant pas réagi
- 0.5% eBSV dans ADN de plante

- 1) Immunocapture : concentration du virus depuis un broyat de plante
- 2) Rinçage : BSV retenus par les AC + ADN résiduel de plante
- 3) PCR avec **amorces** qui vont réagir avec la région RT/RNase de l'ORF3
→ Les **contaminations** par l'ADN résiduel de la plante faussent le résultat

Comment discriminer l'ADN viral et l'ADN des eBSV de la plante?

→ **Intégration d'un contrôle ADN plante (amorce) au test**

	Plante infectée par le BSV	Plante saine porteuse d'eBSV
PCR	+	+
IC - PCR	+	— + —

Manque de fiabilité!

Une détection fiable : la Multiplex IC-PCR

Le Provost et al., 2006, Journal of Virological Methods

Le but est de garantir le produit amplifié comme provenant de la **particule virale seule**. Il s'agit de l'IC-PCR qui utilise **deux amorces**, d'où son nom de multiplex IC-PCR. L'une est **spécifique du BSV** et l'autre **spécifique de l'ADN de la plante** (microsatellites). Cette dernière constitue en quelque sorte un « **espion** » à l'intérieur du tube. Les contaminations éventuelles d'ADN de plante sont ainsi détectées.



Résultat de l'électrophorèse, après Multiplex IC-PCR

- **(M)**: Marqueur moléculaire en kpb
- **(A)**: amplification ADN du virus et ADN de plante (fonctionnement des microsatellites)
→ tests biaisés → diagnostic = plant infecté ou non?
- **(B)**: amplification uniquement pour le virus → diagnostic = plant infecté

Et ensuite?

- ❖ Diagnostic de la forme libre fiable... **MAIS** diffusion de bananiers hybrides silencieux (eBSV) à risque

- ❖ Méthodes de **génotypage** des eBSV → implique la connaissance de la structure des eBSV

La structure des eBSV étant variable selon les espèces de BSV, ces méthodes restent complexes à développer...